

19 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift  
11 DE 33 34 170 A 1

51 Int. Cl. 3:  
C 07 H 17/08  
G 01 N 33/86

21 Aktenzeichen: P 33 34 170.2  
22 Anmeldetag: 21. 9. 83  
43 Offenlegungstag: 22. 3. 84

DE 33 34 170 A 1

30 Unionspriorität: 32 33 31

21.09.82 HU 3020-82

71 Anmelder:

Reanal Finomvegyszergyár, Budapest, HU

74 Vertreter:

Beszédes, S., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw., 8060  
Dachau

72 Erfinder:

Rák, Kálmán, Dr., 4012 Debrecen, HU; Boda, Zoltán,  
Dr., 4029 Debrecen, HU; Bognár, Rezső, Dr.;  
Sztaricskai, Ferenc, Dr., 4032 Debrecen, HU; Zajka,  
Gabriella, 1145 Budapest, HU

Patentamt

4 Verfahren zur Herstellung von A-Ristomycinsalzen und/oder A-Ristomycin und/oder Derivaten derselben beziehungsweise desselben hoher Reinheit sowie diese Verbindung(en) enthaltende Reagenzien zur Anwendung in Thrombozytenaggregationsversuchen und Verfahren zur Herstellung der letzteren

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von A-Ristomycinsalzen und/oder A-Ristomycin und/oder Derivaten derselben hohen Reinheit der allgemeinen Formel I des Patentanspruchs 1, worin  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ , X und Y wie im Anspruch 1 festgelegt sind, bei welchem

I) der pH-Wert einer wäßrigen Lösung der rohen Ristomycinbase mit einer Mineralsäure oder eines verunreinigten A-Ristomycinsalzes mit einer Alkalilösung auf 6,7 bis 7,0 eingestellt und die Lösung mit einem Carbonsäurenitril behandelt wird und das A-Ristomycinsalz und/oder A-Ristomycin kristallisiert wird und gegebenenfalls in einem organischen Lösungsmittel gelöst beziehungsweise suspendiert und danach acyliert wird oder

II) eine Lösung beziehungsweise Suspension eines rohen A-Ristomycinsalzes oder von roher Ristomycinbase oder eines rohen Ristomycinsalzes in einem organischen Lösungsmittel acyliert wird

sowie die erhaltenen Produkte isoliert werden.

Gegenstand der Erfindung sind auch diese Verbindungen enthaltende Reagenzien und ein Verfahren zur Herstellung der letzteren.

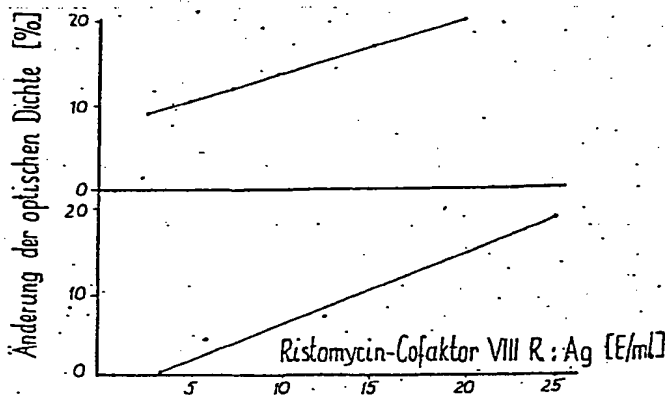


Fig. 2

21.09.83

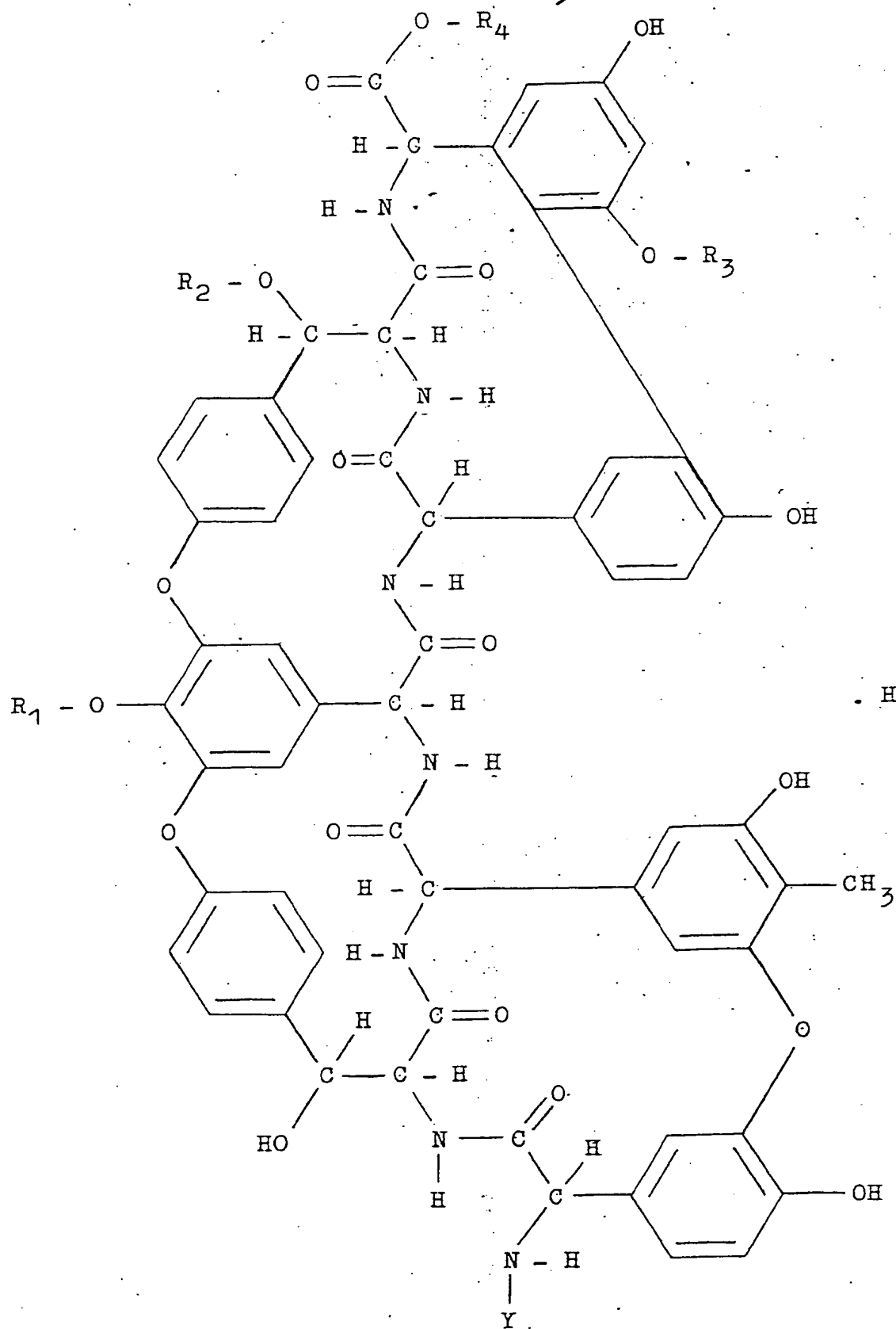
3334170

- 2 -

Patentansprüche

- (1.) Verfahren zur Herstellung von A-Ristomycinsalzen und/oder A-Ristomycin und/oder Derivaten derselben beziehungsweise desselben hoher Reinheit der allgemeinen Formel

- 3 - 2



I,

HX

21.09.83

3334170

-4-3.

worin

$R_1$  für einen  $\{[O-\alpha-D\text{-Arabinofuranosyl}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-D\text{-mannopyranosyl}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-L\text{-rhamnopyranosyl}]_1 \rightarrow 6[-O-\beta-D\text{-glucopyranosyl}]\}$ -Rest  
 $\langle\{[O-\alpha-D\text{-Araf}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-D\text{-Manp}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-L\text{-Rhap}]_1 \rightarrow 6[-O-\beta-D\text{-Glop}]\}\rangle$ -Rest  
 steht,

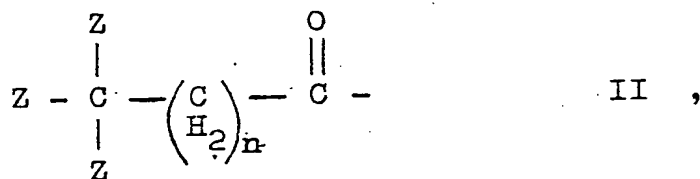
$R_2$  einen 2,3,6-Tridesoxy-3-amino- $\begin{bmatrix} N-Y \\ | \\ H \end{bmatrix}$ - $\alpha$ -L-ribo-hexapyranosylrest bedeutet,

$R_3$  einen  $\alpha$ -D-Mannopyranosylrest darstellt,

$R_4$  für einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) steht,

X einen Mineralsäurerest bedeutet und

Y ein Wasserstoffatom oder einen Rest der allgemeinen Formel



in welcher

Z für ein Wasserstoff- oder Halogenatom steht und

n eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist,

darstellt,

- 5 -

dadurch gekennzeichnet, daß man

- I) a) den pH-Wert einer 30 bis 50 gew.-%-igen wäßrigen Lösung der rohen Ristomycinbase durch Behandeln mit einer Mineralsäure auf 6,7 bis 7,0 einstellt und die Lösung davor und/oder danach, gegebenenfalls unter Zwischenschalten eines Klärens und Filtrierens, mit einem mit Wasser mischbaren niederen aliphatischen Carbonsäurenitril in einer Menge von 15 bis 50% [Vol./Vol.] bei Raumtemperatur, gegebenenfalls mehrmals, behandelt oder
- b) den pH-Wert einer 30 bis 50 gew.-%-igen wäßrigen Lösung eines verunreinigten A-Ristomycinsalzes oder rohen Ristomycinsalzes mit einer Alkalilösung auf 6,7 bis 7,0 einstellt und die Lösung davor und/oder danach, gegebenenfalls unter Zwischenschalten eines Klärens und Filtrierens, mit einem mit Wasser mischbaren niederen aliphatischen Carbonsäurenitril in einer Menge von 15 bis 50% [Vol./Vol.] bei Raumtemperatur, gegebenenfalls mehrmals, behandelt

und darauffolgend das A-Ristomycinsalz und/oder A-Ristomycin bei  $+4^{\circ}\text{C}$  kristallisiert und gegebenenfalls, gegebenenfalls nach seinem Reinigen, in einem organischen Lösungsmittel löst beziehungsweise suspendiert und danach mit einem Acylierungsmittel vom Säureanhydridtyp bei einer Temperatur von  $0$  bis  $20^{\circ}\text{C}$  acyliert oder

II) eine Lösung beziehungsweise Suspension eines,

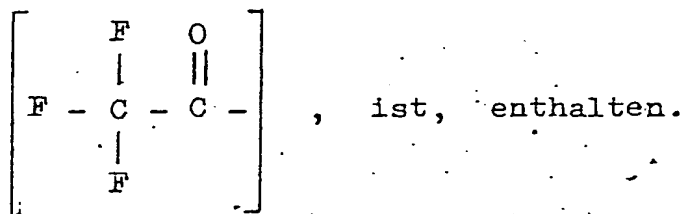
gegebenenfalls nach I) erhaltenen, rohen A-Ristomycinsalzes oder von roher Ristomycinbase oder eines rohen Ristomycinsalzes in einem organischen Lösungsmittel mit einem Acylierungsmittel behandelt

sowie beziehungsweise die erhaltene(n) Produkt(e) isoliert und gegebenenfalls (weiter)reinigt.

- 2.) Verfahren nach Anspruch 1 I) a), dadurch gekennzeichnet, daß man als Mineralsäure verdünnte Schwefelsäure verwendet.
- 3.) Verfahren nach Anspruch 1 I) b), dadurch gekennzeichnet, daß man als verunreinigtes A-Ristomycinsalz ein verunreinigtes A-Ristomycinsulfat, insbesondere A-Ristomycinmonosulfat, verwendet.
- 4.) Verfahren nach Anspruch 1 I) b) oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als Alkalilösung eine Ammoniumhydroxydlösung verwendet.
- 5.) Verfahren nach Anspruch 1 I) oder 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man das Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 vornimmt.
- 6.) Verfahren nach Anspruch 1 I) oder 2 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß man das aliphatische Carbonsäurenitril in einer Menge von 20 bis 50% [Vol./Vol.] verwendet.
- 7.) Verfahren nach Anspruch 1 I) oder 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man als aliphatisches Carbonsäurenitril Acetonitril verwendet.
- 8.) Verfahren nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als organisches Lösungsmittel ein Alka-

nol, insbesondere mit 1 bis 5 Kohlenstoffatom(en),  
oder ein Gemisch von Alkanolen verwendet.

- 9.) Verfahren nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Acylierungsmittel Trifluoressigsäureanhydrid verwendet.
- 10.) Reagenzien zur Anwendung in Thrombozytenaggregationsversuchen, insbesondere zur Diagnostizierung der Willebrand-Krankheit, dadurch gekennzeichnet, daß sie 1 oder mehr nach dem Verfahren nach Anspruch 1 bis 9 hergestellte[s] standardisierte[s] hochreine[s] A-Ristomycinsalz(e) und/oder A-Ristomycin und/oder 1 oder mehr Derivat(e) desselben beziehungsweise derselben enthalten.
- 11.) Reagenzien nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß sie als A-Ristomycinsalz beziehungsweise Derivat(e) eines solchen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise welchen der Mineralsäurerest, für den X stehen kann, ein Schwefelsäurerest, insbesondere Bisulfatrest, ist, enthalten.
- 12.) Reagenzien nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie als Derivat(e) eines A-Ristomycinsalzes beziehungsweise von A-Ristomycinsalzen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise welchen der Rest der allgemeinen Formel II, für welchen Y stehen kann, ein solcher, in welchem Z für ein Fluoratom steht, insbesondere der Trifluoracetylrest



- 13.) Reagenzien nach Anspruch 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie als A-Ristomycinsalz(e) beziehungsweise Derivat(e) eines solchen beziehungsweise von solchen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise

- 8 - 7.

welchen der Alkylrest, für den  $R_4$  stehen kann, ein solcher mit 1 oder 2 Kohlenstoffatom(en) ist, enthalten.

- 14.) Reagenzien nach Anspruch 10 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß sie als A-Ristomycinsalz beziehungsweise Derivat(e) eines solchen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise welchen n 0 oder 1 ist, enthalten.
- 15.) Verfahren zur Herstellung der Reagenzien nach Anspruch 10 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß man das beziehungsweise die nach Anspruch 1 bis 13 hergestellte(n) auf übliche Weise fertiggestellte(n) A-Ristomycinsalz(e) und/oder A-Ristomycin und/oder Derivat(e) desselben beziehungsweise derselben unmittelbar vor der Anwendung in einer bekannten wäßrigen Pufferlösung löst.
- 16.) Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß man als wäßrige Pufferlösung eine wäßrige tris-(Hydroxymethyl)-aminomethanolösung verwendet.

Beschreibung



DR. STEPHAN G. BESZÉDES

PATENTANWALT

VNR: 101265

ZUGELASSENER VERTRETER  
AUCH BEIM EUROPÄISCHEN PATENTAMT

PROFESSIONAL REPRESENTATIVE ALSO  
BEFORE THE EUROPEAN PATENT OFFICE

8.

8060 DACHAU BEI MÜNCHEN

POSTFACH 1168

MÜNCHENER STRASSE 80A

Bundesrepublik Deutschland

TELEPHON: DACHAU 08131 / 4371

TELEX: 527 537 bepät d

Postcheckkonto München (BLZ 700 100 80)

Konto Nr. 1 368 71-801

Bankkonto Nr. 906 370 bei der Sparkasse Dachau

(BLZ 700 515 40)

(VIA Bayerische Landesbank

Girozentrale, München)

P 1 814

Patentansprüche und Beschreibung

zur Patentanmeldung

REANAL FINOMVEGYSZERGYÁR

Budapest, Ungarn

betreffend

Verfahren zur Herstellung von A-Ristomycin-  
salzen und/oder A-Ristomycin und/oder Deri-  
vaten derselben beziehungsweise desselben hoher  
Reinheit sowie diese Verbindung(en) enthal-  
tende Reagenzien zur Anwendung in Thrombo-  
zytenaggregationsversuchen und Verfahren  
zur Herstellung der letzteren

3334170

21.09.83

- 8 - 9.

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von A-Ristomycinsalzen und/oder A-Ristomycin und/oder Derivaten derselben der allgemeinen Formel



HX

worin

$R_1$  für einen  $\{[O-\alpha-D\text{-Arabinofuranosyl}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-D\text{-mannopyranosyl}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-L\text{-rhamnopyranosyl}]_1 \rightarrow 6[-O-\beta-D\text{-glucopyranosyl}]\}$ -Rest,  $\langle\{[O-\alpha-D\text{-Araf}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-D\text{-Manp}]_1 \rightarrow 2[-O-\alpha-L\text{-Rhap}]_1 \rightarrow 6[-O-\beta-D\text{-Glop}]\}\rangle$ -Rest steht,

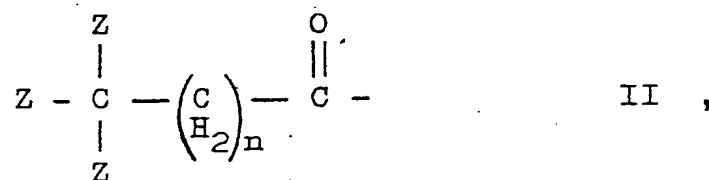
$R_2$  einen 2,3,6-Tridesoxy-3-amino- $\begin{bmatrix} N-Y \\ | \\ H \end{bmatrix}$ - $\alpha-L$ -ribo-hexapyranosylrest bedeutet,

$R_3$  einen  $\alpha-D$ -Mannopyranosylrest darstellt,

$R_4$  für einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) steht,

$X$  einen Mineralsäurerest bedeutet und

$Y$  ein Wasserstoffatom oder einen Rest der allgemeinen Formel



in welcher

$Z$  für ein Wasserstoff- oder Halogenatom steht und

$n$  eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist,

darstellt,

sowie biologische Reagenzien zur Anwendung in Thrombozytenaggregationsversuchen, insbesondere zur Diagnostizierung der Willebrand-Krankheit, und ein Verfahren zur Herstellung der letzteren.

Es ist bekannt, daß bei der Reihenuntersuchung von hämophilen Kranken in der Beurteilung der Blutplättchenfunktionen die wertvollsten Angaben durch die Thrombozytenaggregationsversuche geliefert werden. Neben den routinemäßig verwendeten Aggregationsmitteln (zum Beispiel Adenosindiphosphorsäure [ADP], Adrenalin und Kollagen) spielt seit 1971 die als Ristocetin genannte, vorher als Antibioticum verwendete Substanz eine wichtige Rolle. Auf Grund der Versuche von Howard und Firkin ermöglichte das Ristocetin die schnelle und einfache Erkennung der angeborenen beziehungsweise mitgebrachten Hämophilie, der Willebrand-Krankheit (Thrombosis und Diathesis Haemorrhagica 26 [1971], 362).

Das Wesen der Willebrand-Krankheit ist der Ausfall beziehungsweise Defekt des VIII. Faktorkomplexes der Blutgerinnung. Die wichtigste biologische Rolle des Willebrand-Faktors besteht in der Förderung der Thrombozytenhaftung beziehungsweise Thrombozytenadhäsion an die subendothelialen Formeln. Der Mangel an oder die qualitative Störung [des] Willebrand-Faktor[s] ruft das als Willebrand-Krankheit genannte Krankheitsbild hervor, welches die am meisten verbreitete Form der angeborenen Hämophilie darstellt. Es ist sehr wichtig, den an Willebrand-Krankheit leidenden Kranken auszusondern (Vererbung, Familienversuche, Therapie). Besonders die Aufklärung und Absonderung eines derartigen Krankheitsbildes vor dem operativen Eingriff ist von grundlegender Bedeutung.

Von sowjetischen Forschern wurde das Ristomycin-Antibioticum aus Kulturen von *Proactinomyces fructiferi* var. *ristomycin* durch Adsorption, vorteilhaft an einer SzDSz-3- oder SzDV-3-Kationenaustauschersäule, und Eluieren mit einer acetonischen Ammoniaklösung oder einer Ammoniumacetatpufferlösung mit einem pH-Wert von 9 bis 10 isoliert. Das Ristomycin wurde in Form der Base isoliert. Später wurde Ristomycin ähnlich wie Ristocetin in 2 biologisch aktive Bestandteile, in das A- und B-Ristomycin, getrennt. Die Erzeugung des Antibioticums im Betriebsmaßstab wurde ebenfalls offenbart. Zur Bestimmung des Wirkstoffgehaltes der Gärbrühe und der Zwischenprodukte wurde neben der biologischen Wertbestimmung auch ein polarimetrisches Verfahren und ein UV-spektrophotometrisches Verfahren ausgearbeitet (sowjetische Patentschrift 180 754; Antibiotiki 8 [1962], 392; Antibiotiki 9 [1964], 884; Antibiotiki 10 [1965], 217; Antibiotiki 12 [1967], 129; Antibiotiki 16 [1971], 786).

Auch die genaue Struktur des A-Ristomycines wurde bereits bestimmt (J. Org. Chem. 39 [1974], 2 971; J. Antibiot. 32 [1979], 446; Tetrahedron Letters 21 [1980], 2 983; JACS 102 [1980], 7 093).

Ferner ist es bekannt, daß in der Kulturbrühe der Mikroorganismen *Nocardia lurida* NRRL 2430 und *Proactinomyces fructiferi* var. *ristomycini* je 2 biologisch aktive Bestandteile erzeugt werden. Wenn das erhaltene Antibioticum als antibakterielles Heilmittel verwendet wird, stört die Gegenwart des B-Bestandteiles im A-Ristomycin nicht, da gegen pathogene Mikroorganismen beide Wirkstoffe wirksam sind. Der B-Bestandteil weist sogar eine wesentlich höhere baktericide Wirkung als der A-Bestandteil auf.

Im Gegensatz dazu ist jedoch bei der Anwendung der beiden Antibiotica zu hämatologischen Versuchen nur der A-Bestandteil wertvoll. In den Artikeln von Jenkins und Mitarbeitern (Thromb. Res. 7 [1975], 531) wird auf diese Tatsache im Falle des Ristocetines hingewiesen. Von diesen Verfassern wurde festgestellt, daß das B-Ristocetin in normalen Humanthrombozyten nicht aggregiert.

Es ist auch bekannt, daß unter den alkalischen Bedingungen der Gärung und der Ionenaustauscherreinigung beide Ristomycinmoleküle einer Zersetzung unterliegen können. Zur Klärung dieser Vorgänge wird als Modellverbindung das Carboxy-A-ristomycin hergestellt. Es wurde festgestellt, daß diese Verbindung das normale Humanthrombozytenplasma nicht aggregiert und die durch A-Ristomycin induzierte Aggregation nicht hemmt. Dies bedeutet, daß die unter Einwirkung von Alkali stattgefundene Hydrolyse der C-endständigen Methoxycarbonylgruppe des sehr empfindlichen Glykopeptidmoleküles (und die eventuell darauffolgende Retroaldolspaltung an beiden  $\beta$ -Hydroxyphenylserineinheiten) das A-Ristomycinpräparat zu hämatologischen Zwecken vollständig wertlos und unanwendbar machen kann. Nach eigenen Erfahrungen kann das A-Ristomycin von diesen unerwünschten Begleitstoffen mit Hilfe des bei den bekannten Verfahren verwendeten wäßrig-alkoholischen Umkristallisierens nicht befreit werden.

Es ist noch darauf hinzuweisen, daß die Ristomycinbase äußerst hygroskopisch ist. Diese Verbindung kann beim Stehenlassen an der Luft innerhalb einiger Minuten mehr als 15 Gew.-% Feuchtigkeit, bezogen auf das Gewicht der Base, aufnehmen. Daher ist es fast unmöglich, an diesem Präparat eine genaue Einwaage vorzunehmen. Gleichzeitig wurde von der Anmelderin festgestellt, daß die Aggrega-

- 15 -

tionsaktivität der A-Ristomycinproben während des in alltäglicher Laboratoriumspraxis üblichen mit Phosphor-pentoxyd durchgeführten Trocknens einer irreversiblen Schädigung unterliegt.

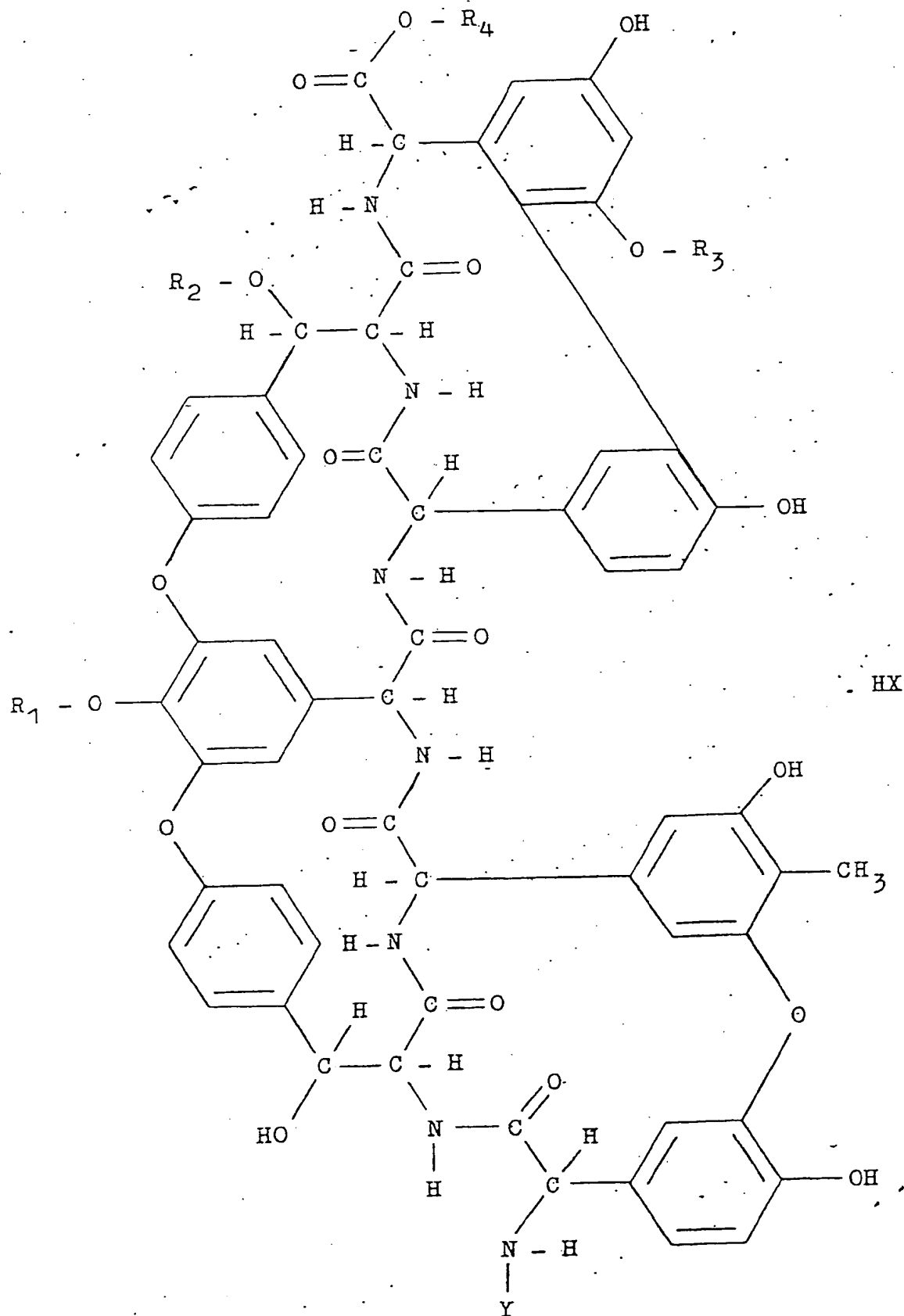
Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von in biologischen Versuchen gut geeigneten beziehungsweise geeignetem Ristomycinsalzen und/oder Ristomycin und/oder Derivaten derselben beziehungsweise desselben in sehr hoher Reinheit sowie Reagenzien zur Anwendung in Thrombozytenaggregationsversuchen, insbesondere zur Diagnostizierung der Willebrand-Krankheit, mit einem Gehalt an 1 oder mehr Verbindung(en) mit in diesen Versuchen verwendbarer Struktur und ein Verfahren zur Herstellung dieser Reagenzien zu schaffen.

Das Obige wurde überraschenderweise durch die Erfindung erreicht.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von A-Ristomycinsalzen und/oder A-Ristomycin und/oder Derivaten derselben beziehungsweise desselben beziehungsweise von Ristomycinderivaten hoher Reinheit der allgemeinen Formel

- 16 -





I,

HX

worin

$R_1$  für einen  $\{[O-\alpha-D\text{-Arabinofuranosyl}]_1 - 2[-O-\alpha-D\text{-mannopyranosyl}]_1 - 2[-O-\alpha-L\text{-rhamnopyranosyl}]_1 - 6[-O-\beta-D\text{-glucopyranosyl}]\}$ -Rest  
 $\langle\{[O-\alpha-D\text{-Araf}]_1 - 2[-O-\alpha-D\text{-Manp}]_1 - 2[-O-\alpha-L\text{-Rhap}]_1 - 6[-O-\beta-D\text{-Glop}]\}\rangle$ -Rest  
 steht,

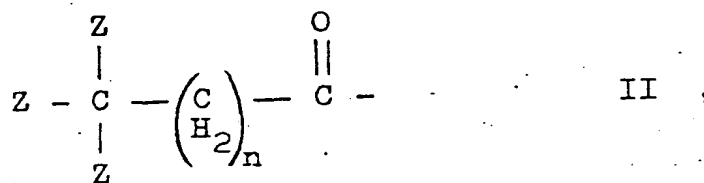
$R_2$  einen 2,3,6-Tridesoxy-3-amino- $\begin{bmatrix} N-Y \\ | \\ H \end{bmatrix}$ - $\alpha$ -L-  
 -ribo-hexapyranosylrest bedeutet,

$R_3$  einen  $\alpha$ -D-Mannopyranosylrest darstellt,

$R_4$  für einen Alkylrest mit 1 bis 4 Kohlenstoffatom(en) steht,

X einen Mineralsäurerest bedeutet. und

Y ein Wasserstoffatom oder einen Rest der allgemeinen Formel



in welcherletzterer

Z für ein Wasserstoff- oder Halogenatom steht und

n eine ganze Zahl von 0 bis 5 ist,

darstellt,

welches dadurch gekennzeichnet ist, daß

- I) a) der pH-Wert einer 30 bis 50 gew.-%-igen wäßrigen Lösung der rohen Ristomycinbase durch Behandeln mit einer Mineralsäure auf 6,7 bis 7,0 eingestellt und die Lösung davor und/oder danach, gegebenenfalls unter Zwischenschalten eines Klärens, vorzugsweise mit Aktivkohle, und Filtrierens, mit einem mit Wasser mischbaren niederen aliphatischen Carbonsäurenitril in einer Menge von 15 bis 50% [Vol./Vol.] bei Raumtemperatur, gegebenenfalls mehrmals, behandelt wird oder
- b) der pH-Wert einer 30 bis 50 gew.-%-igen wäßrigen Lösung eines verunreinigten A-Ristomycinsalzes oder rohen Ristomycinsalzes mit einer Alkalilösung auf 6,7 bis 7,0 eingestellt und die Lösung davor und/oder danach, gegebenenfalls unter Zwischenschalten eines Klärens, vorzugsweise mit Aktivkohle, und Filtrierens, mit einem mit Wasser mischbaren niederen aliphatischen Carbonsäurenitril in einer Menge von 15 bis 50% [Vol./Vol.] bei Raumtemperatur, gegebenenfalls mehrmals, behandelt wird

und darauffolgend das A-Ristomycinsalz und/oder A-Ristomycin bei +4°C kristallisiert wird und gegebenenfalls, gegebenenfalls nach seinem Reinigen, vorzugsweise durch Umkristallisieren, in einem organischen Lösungsmittel gelöst beziehungsweise suspendiert und danach mit einem Acylierungsmittel vom Säureanhydridtyp bei einer Temperatur von 0 bis 20°C acyliert wird oder

- II) eine Lösung beziehungsweise Suspension eines, gegebenenfalls nach I) erhaltenen, rohen A-Ristomycinsalzes oder von roher Ristomycinbase oder eines rohen Ristomycinsalzes in einem organischen Lösungs-

21.09.83

mittel mit einem Acylierungsmittel, vorzugsweise vom Säureanhydridtyp, behandelt wird

sowie das beziehungsweise die erhaltene(n) Produkt(e) isoliert und gegebenenfalls (weiter)gereinigt wird beziehungsweise werden.

Im Falle von A-Ristomycin fehlt in der allgemeinen Formel I der Teil HX.

Gegebenenfalls kann das A-Ristomycin aus seinen Salzen in üblicher Weise freigesetzt werden.

Vorzugsweise wird bei der Variante I) a) des erfindungsgemäßen Verfahrens als Mineralsäure verdünnte Schwefelsäure verwendet.

Vorzugsweise wird bei der Variante I) b) des erfindungsgemäßen Verfahrens als verunreinigtes A-Ristomycin-salz ein verunreinigtes A-Ristomycinsulfat, insbesondere A-Ristomycinmonosulfat, verwendet.

Es ist auch bevorzugt, bei der Variante I) b) des erfindungsgemäßen Verfahrens als Alkalilösung eine Ammoniumhydroxydlösung zu verwenden.

Vorzugsweise wird das Einstellen des pH-Wertes auf 6,8 vorgenommen.

Es ist auch bevorzugt, das aliphatische Carbonsäurenitril in einer Menge von 20 bis 50% [Vol./Vol.] zu verwenden.

Ferner ist es bevorzugt, als aliphatisches Carbonsäurenitril Acetonitril zu verwenden.

Weiterhin ist es bevorzugt, als organisches Lösungsmittel ein Alkanol, insbesondere mit 1 bis 5 Kohlenstoffatom(en), oder ein Gemisch von Alkanolen zu verwenden.

Insbesondere wird als Acylierungsmittel Trifluoressigsäureanhydrid verwendet.

Nach einer vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird wie folgt vorgegangen.

Nach einer vorteilhaften Variante [a)] des erfindungsgemäßen Verfahrens wird also der pH-Wert einer aus der nach einem bekannten Gärverfahren hergestellten rohen Ristomycinbase durch deren Lösen in destilliertem Wasser bei Raumtemperatur hergestellten 30 bis 50 gew.-%-igen wäßrigen Lösung mit einer Mineralsäure, vorzugsweise verdünnter Schwefelsäure, auf 6,7 bis 7,0 eingestellt.

Als Ausgangsstoff kann auch ein rohes A-Ristomycinsalz, vorzugsweise rohes A-Ristomycinsulfat, insbesondere A-Ristomycinmonosulfat, eingesetzt werden. Nach einer anderen vorteilhaften Variante [b)] des erfindungsgemäßen Verfahrens wird also der gewünschte pH-Wert von 6,7 bis 7,0 einer 30 bis 50 gew.-%-igen wäßrigen Lösung des rohen A-Ristomycinsalzes, wie A-Ristomycinsulfates, durch Zugabe einer verdünnten Alkalilösung, vorzugsweise Ammoniumhydroxydlösung, eingestellt.

Das Einstellen des optimalen pH-Wertes kann mit Hilfe von Instrumentenmessung oder vorteilhaft des Umschlagens eines Bromthymolblauindikators von Gelb in Himmelblau durchgeführt werden.

Zur nach einer der obigen vorteilhaften Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens vorbereiteten Lösung wird eine Menge von 15 bis 50% [Vol./Vol.], vorzugsweise 20 bis 50% [Vol./Vol.], eines mit Wasser mischbaren niederen aliphatischen Carbonsäurenitriles (Alkylnitriles),

vorzugsweise von Acetonitril, zugegeben, worauf die Kristallisation beginnt.

Nach einer anderen vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens kann bei beiden obigen Varianten [a) und b)] des erfindungsgemäßen Verfahrens beim Kristallisieren eines Rohproduktes höherer Reinheit auch in der Weise vorgegangen werden, daß der wäßrigen A-Ristomycinsalzlösung, vorzugsweise A-Ristomycinsulfatlösung, zunächst 15 bis 50% [Vol./Vol.], vorzugsweise 20 bis 50% [Vol./Vol.], eines mit Wasser mischbaren niederen aliphatischen Carbonsäurenitriles (Alkylnitriles), vorzugsweise von Acetonitril, zugesetzt werden, danach der pH-Wert auf 6,7 bis 7,0 eingestellt wird und die opaleszierende Lösung bis zum Lösen erwärmt und langsam auf Raumtemperatur abkühlen gelassen wird.

Die Kristalle werden auf dem Filter mit einem Gemisch von Aceton und Wasser und/oder mit Aceton gewaschen und darauffolgend in einem Vakuumexsikkator über vorher erhitztem Calciumchlorid und Paraffinspänen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

So kann das eine ausgezeichnete Aggregationsfähigkeit aufweisende, nicht hygroskopische, kristalline A-Ristomycinsulfat hoher Reinheit in einer Ausbeute von 60 bis 80% (je nach dem Wirkstoffgehalt des Ausgangsstoffes) erhalten werden.

Nach einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das rohe A-Ristomycinsalz, wie A-Ristomycinsulfat, in einem organischen Lösungsmittel, vorzugsweise in einem Alkanol, insbesondere einem solchen mit 1 bis 5 Kohlenstoffatom(en), oder einem Gemisch von Alkanolen gelöst beziehungsweise suspendiert, worauf

ein Acylierungsmittel, insbesondere Trifluoressigsäureanhydrid, zugetropft wird. Das Rohprodukt kann, falls es erwünscht ist durch Umkristallisieren gereinigt werden.

Es ist klar, daß bei der Isolierung des Antibioticums zum Nachweis von etwaigen Begleitstoffen und Verunreinigungen, nämlich des B-Bestandteiles und der durch alkalische Zersetzung gebildeten verschiedenen Produkte, die bisher verwendeten Meßverfahren (bekannte Testmikroorganismen verwendendes biologisches Verfahren, UV-spektrophotometrische Wirkstoffbestimmung und Messung des optischen Drehvermögens) allein nicht ausreichen. Die Begleitstoffe weisen nämlich bei 280 nm ebenfalls eine UV-Lichtabsorption auf und haben ein optisches Drehvermögen ähnlichen Sinnes.

Es wurden eigene Versuche unternommen, um aufzuklären, in welchem Maße und inwieweit die Änderung der Struktur der Verbindung beziehungsweise der Reinheitsgrad des A-Ristomycines die Thrombozytenaggregation beeinflussen.

Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß die partielle oder vollständige Entfernung der Reste, für die  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  und  $R_4$  in der allgemeinen Formel I stehen, beziehungsweise die Blockierung der Hydroxyfunktionen solcher Reste und der phenolischen Hydroxygruppen (in Form eines Esters oder Äthers) unerwünschte biologische Wirkungen des Antibioticums und in manchen Fällen auch eine ungünstige Änderung der Löslichkeit zur Folge haben. Das durch Ersetzen des Alkylrestes, für den  $R_4$  steht, durch ein Wasserstoffatom beziehungsweise eine Carboxylgruppe erhaltene Carboxy-A-ristomycin übt keine das Humanthrombozytenplasma aggregierende Wirkung aus und hemmt die durch Ristomycin induzierte Thrombozytenaggregation. Das an den phenolischen Hydroxygruppen blockierte Tetra-O-(methyl)-A-ristomycinderivat

(statt des Wasserstoffes der phenolischen Hydroxygruppen Methylreste und  $R_4$  = Methylrest) hat ebenfalls ungünstige Eigenschaften. Das peracetylierte A-Ristomycin ist unter den bei den Versuchen verwendeten Bedingungen unlöslich und zum Zweck der Versuche ungeeignet. Obwohl das durch Beseitigung der Kohlenhydratreste erhaltene Aglyko-A-ristomycin ( $R_1 = R_2 = R_3 = Y$  = Wasserstoff und  $R_4$  = Methylrest) eine Agglutination hervorruft, ist dieses Derivat wegen der pH- und Löslichkeitsverhältnisse ebenfalls nicht optimal. Nach eigenen Kenntnissen ist auch das B-Ristomycin (diese Verbindung unterscheidet sich von den anderen Derivaten nur darin, daß in der allgemeinen Formel I in der Heterotetrasaccharidkette des Restes, für den  $R_1$  steht, der 2-O- $\alpha$ -D-Arabinofuranosyl-O- $\alpha$ -D-mannopyranosylteil fehlt) zum gewünschten diagnostischen Zweck ungeeignet.

Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß der im Blutgerinnungsprüfversuch verwendete Wirkstoff dann und nur dann optimal ist, wenn er eine hohe Reinheit und eine genau definierte Struktur der allgemeinen Formel I aufweist.

Es wurde auf Grund des Obigen festgestellt, daß die zur Ausübung der normalen Humanthrombozytenaggregation erforderliche grundlegende Bedingung darin besteht, daß in der allgemeinen Formel I 4 freie phenolische Hydroxygruppen, der C-endständige Alkoxy-carbonylrest, wie Methoxy-carbonylrest ( $R_4$  = Methylrest), und die unberührte Ristotetrosylseitenkette ( $R_1$ ) vorliegen müssen.

Die Erfindung beruht also auch auf der überraschenden Feststellung, daß das in der Laboratoriumspraxis verbreitet verwendete Ristocetin durch ein anderes Mitglied der

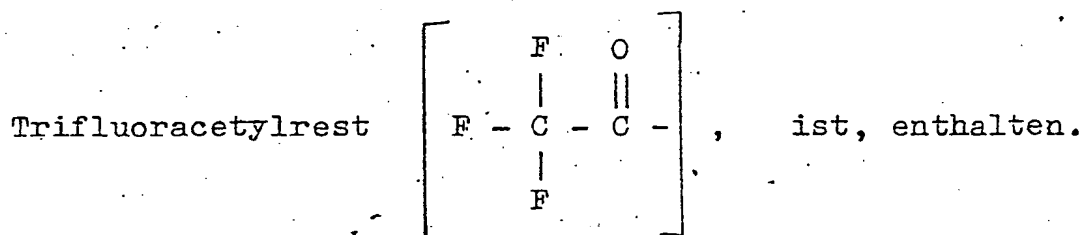


Vancomycin-Antibioticum-Familie, das Ristomycin, vollständig ersetzt werden kann, wenn es genügend rein ist. Das Ristomycin kann einfacher und mit weniger Aufwand hergestellt werden und verhält sich bei der Plasmaproteinfällung günstiger. Auf Grund der obigen Eigenschaften hat sich das Ristomycin in hämatologischen Versuchen als günstiger erwiesen. Das bisher zur Behandlung von durch bakterielle Infektionen hervorgerufenen Krankheiten verwendete Ristomycin kann also auch auf diesem neuen Anwendungsgebiet, das heißt für diagnostische Zwecke, eingesetzt werden.

Gegenstand der Erfindung sind auch Reagenzien zur Anwendung in Thrombozytenaggregationsversuchen, insbesondere zur Diagnostizierung der Willebrand-Krankheit, welche dadurch gekennzeichnet sind, daß sie 1 oder mehr, nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte[s] standardisierte[s], hochreine[s] A-Ristomycinsalz(e) und/oder Ristomycin A und/oder 1 oder mehr Derivat(e) desselben beziehungsweise derselben enthalten.

Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Reagenzien, als A-Ristomycinsalz beziehungsweise Derivat(e) eines solchen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise welchen der Mineralsäurerest, für den X stehen kann, ein Schwefelsäurerest, insbesondere Bisulfatrest, ist. Dabei ist A-Ristomycinmonosulfat besonders bevorzugt.

Es ist auch bevorzugt, daß die erfindungsgemäßen Reagenzien als Derivat(e) eines A-Ristomycinsalzes beziehungsweise von A-Ristomycinsalzen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise welchen der Rest der allgemeinen Formel II, für welchen Y stehen kann, ein solcher, in welchem Z für ein Fluoratom steht, insbesondere der



Dabei ist ein Gehalt an 1 oder mehr bis-(N,N'-Trifluoracetyl)-A-ristomycinsalz(en), vor allem bis-(N,N'-Trifluoracetyl)-A-ristomycinmonosulfat, besonders bevorzugt.

Ferner ist es bevorzugt, daß die erfindungsgemäßen Reagenzien als A-Ristomycinsalz(e) beziehungsweise Derivat(e) eines solchen beziehungsweise von solchen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise welchen der Alkylrest, für den R<sub>4</sub> stehen kann, ein solcher mit 1 oder 2 Kohlenstoffatom(en) ist, enthalten.

Weiterhin ist es bevorzugt, daß die erfindungsgemäßen Reagenzien als A-Ristomycinsalz(e) beziehungsweise Derivat(e) eines solchen beziehungsweise von solchen [ein] solche[s], in welchem beziehungsweise welchen n 0 oder 1 ist, enthält

Ferner ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Reagenzien, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß das beziehungsweise die erfindungsgemäß hergestellte(n) auf übliche Weise fertiggestellte(n) A-Ristomycinsalz(e) und/oder A-Ristomycin und/oder Derivat(e) desselben beziehungsweise derselben unmittelbar vor der Anwendung in einer bekannten wäßrigen Pufferlösung gelöst wird beziehungsweise werden.

In diesem wird als wäßrige Pufferlösung vorteilhaft eine wäßrige tris-(Hydroxymethyl)-aminomethanolösung [tris-Hydroxyaminomethanolösung] verwendet.

Die Erfindung beruht wie bereits erwähnt auf der überraschenden Feststellung, daß A-Ristomycinsalze beziehungsweise A-Ristomycin hoher Reinheit und deren Derivate der allgemeinen Formel I zur Durchführung von bisher durch A-Ristocetin induzierten Thrombocytenaggregationsversuchen ausgezeichnet geeignet sind.

Bei den Versuchen, deren Ergebnisse in der beiliegenden Figur 1 veranschaulicht sind, wurden unter Verwendung von 6 verschiedenen PRP-Citrat [PRP bedeutet an Thrombozyten reiches Plasma] und Äthylendiamintetraessigsäure-PRP und Durchschnittswertbehandlung die Punkte der in der Figur 1 dargestellten Kurven erhalten. Die Kurven zeigen einen ähnlichen Verlauf und weisen 3 voneinander gut trennbare Abschnitte auf. Bei geringerer Konzentration (0,8 mg/ml) ist keine Agglutination festzustellen. Im Bereich von Konzentrationen von 0,8 bis 2,0 mg/ml ist ein linearer Zusammenhang zu beobachten. Bei Konzentrationen über 2,0 mg/ml verlaufen die Kurven in Richtung der oberen Wertspitze. Bei weiterer Erhöhung der Dosis wird die Plasmaproteinfällung ein immer stärker störender Faktor. Bei Verwendung von Citrat- und Äthylendiamintetraessigsäure-PRP als Substrat werden identische Ergebnisse erhalten.

In der beiliegenden Figur 2 ist gezeigt, daß A-Ristomycin zur quantitativen Bestimmung des Cofaktors VIII R:Ag sehr gut eingesetzt werden kann. Die sogenannten Ristocetin-Cofaktor-Assay-Versuche dienen der Messung des sich in der Willebrand-Krankheit ergebenden Plasmafaktordefizites (J. Clin. Invest. 52 [1973], 2 708; Thromb. Diath. Haemorrh. 34 [1975], 306). Die erhaltenen Ergebnisse zeigen, daß das A-Ristomycin zum Zweck der quantitativen Versuche ebenfalls ausgezeichnet geeignet

ist und der Ristocetin-Cofaktor und Ristocetin-Cofaktor-Assay-Versuch durch den Ristomycin-Cofaktor beziehungsweise Ristomycin-Cofaktor-Assay-Versuch ersetzt werden können. Die Bestimmung des Ristomycin-Cofaktors kann unter Verwendung von sowohl mit gewaschenen (Figur 2, obere Kurve) als auch mit 35 bis 40 gew.-%-iger wäßriger Formaldehydlösung (Formalin) behandelten (Figur 2, untere Kurve) Thrombozyten durchgeführt werden. Das Ristocetin und Ristomycin rufen bei höheren Konzentrationen eine Plasmaproteinfällung hervor. Die bei den Werten zwischen 1,5 und 3,5 mg/ml erhaltenen Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle

Konzentration in mg/ml	Lichtabsorption (gemessen bei 600 nm)	
	Ristomycin (als A-Ristomycin- monosulfat)	Ristocetin [Vergleichsver- such]
1,5	0,01	0,01
2,7	0,20	0,07
3,0	0,55	0,15
3,5	2,02	0,66

Aus der obigen Tabelle geht hervor, daß mit dem erfindungsgemäß verwendeten A-Ristomycinmonosulfat über Konzentrationen von 1,5 mg/ml stets höhere Absorptionswerte erhalten werden als mit dem Ristocetin.

Es wurde überraschenderweise festgestellt, daß die Grundbedingung der Zuverlässigkeit des Verfahrens mit dem erfindungsgemäß hergestellten Ristomycin darin liegt, daß das zum Versuch verwendete Reagens eine hohe Reinheit aufweist und ein A-Ristomycinsalz beziehungsweise dessen Derivat mit konstantem Wirkstoffgehalt enthält. Diese Erscheinung läßt sich wahrscheinlich auf die Tatsache zurückführen, daß, obwohl Ristocetin und Ristomycin eine ähnliche antibakterielle Wirkung ausüben, die Mikroorganismen, welche diese Verbindungen erzeugen, sehr unterschiedliche Eigenschaften haben. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung des Nährbodens und der Stoffwechselvorgänge der Biosynthese können ganz verschiedene Verunreinigungen gebildet werden, auch wenn die Aufarbeitung identisch ist.

Die erfindungsgemäßen Reagenzien enthalten 1 oder mehr nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte[s] standardisierte[s], hochreine[s], Gewichtskonstanz aufweisende[s] und stabile[s] A-Ristomycinsalz(e) und/oder A-Ristomycin und/oder Derivat(e) desselben beziehungsweise desselben. Die erfindungsgemäßen Reagenzien (wie AGGRISTIN<sup>®</sup>) enthalten vorzugsweise Doseneinheiten von 15 mg. Die freien phenolischen Hydroxygruppen des Reagens können jedoch bei längerer Lagerung, in Gegenwart von Luftsauerstoff und unter Einwirkung von Sonnenlicht eine für die Thrombozytenaggregation ungünstige chinoidale Struktur annehmen. Diese Änderung wird durch eine langdauernde (40 Stunden) UV-Belichtung des festen Präparates bestätigt. Auf Grund des vorstehend Gesagten sollen die erfindungsgemäßen Reagenzien zur Hämophilie-Diagnostik-Ausrüstung [Hämophilie-Diagnostik-Kit] in aus braunem Glas hergestellten und hermetisch abgeschlossenen Phiolen fertiggestellt werden.

Die wichtigsten Vorteile der Erfindung sind zusammengefaßt wie folgt:

- A) Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren können in Blutgerinnungsprüfversuchen ausgezeichnet verwendbare A-Ristomycinsalze und A-Ristomycin sowie Derivate derselben beziehungsweise desselben der allgemeinen Formel I hoher Reinheit hergestellt werden.
- B) Die erfindungsgemäßen Reagenzien können in quantitativen Blutplasmaversuchen mit großem Erfolg eingesetzt werden und sichern ein günstigeres Messungsintervall als die bekannten Mittel und Verfahren.
- C) Die erfindungsgemäßen Reagenzien sind verhältnismäßig stabil, ihr Gewicht ist konstant, sie können bei 100°C sterilisiert werden und sind gut lagerfähig.

Eigene Stabilitätsversuche zeigten ohne Zweifel, daß eine Lösung von kristallinem A-Ristomycinmonosulfat in destilliertem Wasser bei 100°C 0,5 bis 1,0 Stunde lang ohne wesentliche Schädigung sterilisiert werden kann. Ferner wurde festgestellt, daß die in den Hämophilie-Diagnostik-Ausrüstungen vorliegenden Reagenzien mit einem Gehalt an A-Ristomycinmonosulfat enthaltenden Lösungen {in Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer [TRIS-Puffer], bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Konzentration von 15 mg/ml} bei +4°C 3 Monate lang ohne Zersetzung gelagert werden können.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

## Herstellung von A-Ristomycinmonosulfat

(Formel I mit  $R_4$  = Methylrest,  
X = Bisulfatrest  $[HSO_4]$  und  
Y = Wasserstoff)

Es wurden 2 g auf bekannte Weise hergestellte rohe Ristomycinbase bei Raumtemperatur in 5,0 ml destilliertem Wasser gelöst, worauf der pH-Wert der Lösung mit einer n Schwefelsäure auf 6,8 eingestellt wurde; der genaue pH-Wert wurde mit einem Instrument gemessen. Die gelbe schwach opaleszierende Lösung wurde mit ein wenig Knochenkohle geklärt und filtriert. Der erhaltenen klaren Lösung wurden bis zur Trübung 15 bis 20% [Vol./Vol.] Acetonitril zugetropft. Das Gemisch wurde bei Raumtemperatur so lange stehengelassen, bis die Kristallisation einsetzte. Diese Maßnahme wurde erforderlichenfalls durch Zugabe einer geringen weiteren Menge von Acetonitril während 2 bis 3 Tage in der Weise wiederholt, daß die Kristallisation mit Hilfe einer 24-stündigen Kühlung in einem Kühlschrank bei  $+4^{\circ}C$  beendet wurde.

Die gebildeten quadratförmigen weißen Kristalle wurden abfiltriert, zunächst 2-mal mit je 1,0 ml einer eiskalten Mischung von Acetonitril und Wasser (im Volumverhältnis von 1 : 1) und danach 2-mal mit je 2 ml kaltem Aceton gewaschen, in einem Vakuumexsikkator über vorher erhitztem Calciumchlorid und Paraffinspänen bei Raumtemperatur unter vermindertem Druck bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Ausbeute 71% der Theorie.

Beispiel 2

Herstellung von A-Ristomycinmonosulfat  
(Formel I mit  $R_4$  = Methylrest,  
X = Bisulfatrest  $[\text{HSO}_4]$  und  
Y = Wasserstoff)

Es wurden 1,5 bis 2,0 g rohes A-Ristomycinmonosulfat als Ausgangsstoff unter ständigem Schütteln in 4,0 ml destilliertem Wasser gelöst. Zur stark schäumenden Lösung wurde 1,0 ml Acetonitril zugegeben und das Gemisch wurde mit Aktivkohle geklärt und filtriert. Der pH-Wert wurde mit einer 2 n Ammoniumhydroxydlösung in Gegenwart eines Bromthymolblauindikators (Umschlag von Gelb in Himmelblau) neutralisiert. Zur Lösung wurde bis zur Trübung eine weitere Menge Acetonitril zugegeben. Das Gemisch wurde bis zum Einsetzen der Kristallisation stehengelassen, die ausgeschiedenen Kristalle wurden durch Erwärmen auf einem Wasserbad wieder gelöst und die Lösung wurde langsam auf Raumtemperatur kühlengelassen. Das weitere Aufarbeiten wurde auf die im Beispiel 1 beschriebene Weise durchgeführt. Ausbeute 65%.

Das nach den Verfahrensweisen der beiden obigen Beispiele isolierte A-Ristomycinmonosulfat hatte ausgezeichnete Thrombozytenaggregationseigenschaften und entsprach den folgenden sehr hohen qualitativen Vorschriften:

- A) Die Zersetzung des Produkts begann bei 165 bis 170°C (gemessen in einem Schmelzpunktapparat mit Photozellenregistrierung [Mettler FP-5]).
- B) Mit Hilfe eines Hochdruckflüssigkeitchromatographierapparates (Hewlett-Packard 1082, HPLC) wurde vom Produkt ein Chromatogramm ausgezeichneter Qualität gefertigt.



- C) Das Produkt war nach der Schichtchromatographie einheitlich. Der in wäßriger Lösung bei 280 nm gemessene Wert  $\log \epsilon$  lag zwischen 4,0 und 4,5 und der Sulfatasorgehalt war nicht höher als 0,25 Gew.-%. Bei einem mit einer Wasserstrahlpumpe (etwa 15 mm Hg) beim Siedepunkt des Acetones 4 Stunden lang kontinuierlich durchgeführten Saugen betrug der Gewichtsverlust des A-Ristomycinmonosulfates höchstens 1 bis 2,5 Gew.-%.

Die dünnschichtchromatographische Charakterisierung des Rohproduktes und des nach den obigen Beispielen 1 und 2 hergestellten A-Ristomycinmonosulfates wurde wie folgt durchgeführt:

Die bei der Bestimmung verwendeten Substanzen und Reagenzien:

- I) Eine frisch hergestellte 1 bis 2 gew.-%-ige wäßrige Lösung der A-Ristomycinmonosulfat-Probe.
- II) 1) DC-Alurolle Zellulose (Merck 0,1 mm) Dünnschicht.  
2) Fixion 50 x 8-Platte (Reanal).
- III) Lösungsmittelgemische als Laufmittel:
  - a) n-Butanol/Pyridin/Essigsäure/Wasser  
(im Volumverhältnis von 15 : 10 : 3 : 12) oder
  - b) n-Butanol/Pyridin/n-Propanol/Essigsäure/Wasser  
(im Volumverhältnis von 20 : 10 : 5 : 3 : 32).Obere organische Phase zur II) 1) Dünnschicht.

Zum Äquilibrieren und Anlaufen der Schicht II) 2) wurde die wie folgt beschrieben hergestellte Citratpufferlösung (pH-Wert = 6) in ionenfreiem Wasser verwendet:

7,0 g Citronensäure,

4,0 g Natriumhydroxyd,

81,9 g Natriumchlorid und

100 ml Äthylenglykolmonomethyläther  
[Methylcellosolve]

wurden in einem 1 000 ml Meßkolben in Wasser gelöst und mit destilliertem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

#### IV) Entwickler: Pauly-Reagens.

0,05 g diazotierte Sulfanilsäure wurde in 10 ml einer 10 gew.-%-igen Natriumcarbonatlösung gelöst und die frisch bereitete Lösung wurde verwendet.

Das reine Rohprodukt zeigte auf der Celluloseschicht in den Lösungsmittelgemischen a) und b)  $R_f$ -Werte von 0,59 beziehungsweise 0,52. Auf einer Fixion 50 x 8-Platte wurde in der Citratpufferlösung (pH-Wert = 6) ein  $R_f$ -Wert von 0,61 gemessen. Das Reagens war sehr empfindlich, durch es wurden praktisch alle Zersetzungsprodukte nachgewiesen; die untere Nachweisgrenze betrug 0,5 bis 1,0 µg.

Die hochdruckflüssigkeitschromatographischen Messungen wurden mit Hilfe eines Apparates vom Typ Hewlett-Packard 1082 HPLC mit isochratischem Betrieb

durchgeführt. Bei den Versuchen wurde eine in eigenen Laboratorien hergestellte analytische Säule verwendet (C<sub>8</sub>-Lichrosorb, 10 µm). Der Wirkstoffgehalt der A-Ristomycinmonosulfat-Proben wurde mit einem bei 254 nm wirkenden UV-Detektor bestimmt. Von den Proben wurden 1 millimolare Lösungen hergestellt, von denen Aliquote von 20 bis 30 µl auf die Säule gespritzt wurden. Die Chromatogramme wurden wie folgt entwickelt:

- A) In einer 12 Gew.-% Äthylenglykolmonomethyläther [Methylcellosolve] enthaltenden Citratpufferlösung (pH-Wert = 6,3), Flüssigkeitsströmung: 2,0 ml/Minute und Papiergeschwindigkeit: 0,1 cm/Minute.
- B) In einer 10 Gew.-% Acetonitril enthaltenden (ameisensäurefreien) 0,1 m Ammoniumformiatlösung (pH-Wert = 7,4), Flüssigkeitsströmung: 3,0 ml/Minute und Papiergeschwindigkeit: 0,3 cm/Minute.

Die obigen Bedingungen haben sich am günstigsten erwiesen.

Die Stabilität des nach den Beispielen 1 und 2 hergestellten kristallinen A-Ristomycinmonosulfates wurde nach UV-Bestrahlung der festen Proben und nach thermischer Sterilisation der wäßrigen Lösungen verschiedener Konzentration beziehungsweise Stehenlassen bei +4°C in einer tris-(Hydroxymethyl)-aminomethanpufferlösung [TRIS-Puffer] bestimmt.

- c) Es wurden 50 bis 100 mg A-Ristomycinmonosulfat in einer mit einem Pfropfen verschlossenen kleinen Flasche mit UV-Licht in der Weise bestrahlt, daß die Entfernung zwischen der die Probe enthaltenden

Flasche und der Lampe etwa 20 cm war. Nach 40-stündiger Bestrahlung wurde die Farbe der hergestellten Lösung etwas tiefer; in einer Konzentration von 15 mg/ml war die Aggregation der Humanthrombozyten ganz langsam.

B) Es wurden von A-Ristomycinmonosulfat in destilliertem Wasser 2 Lösungen ähnlicher Verdünnung (0,399 mg/ml beziehungsweise 0,356 mg/ml) und eine konzentriertere Lösung (6,877 mg/ml) hergestellt. Die Lösungen wurden 3 Stunden lang in einem Wasserbad von 100°C gehalten. Das abgedampfte Wasser wurde gelegentlich ersetzt. Die Lösungen wurden auf Raumtemperatur gekühlt und die  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ -Werte wurden auf Grund der Intensität der bei 280 nm gemessenen Lichtabsorption bestimmt. Die 3 Kurven der  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ -Werte {Ordinate} zu verschiedenen Zeiten (t [Min.] {Abszisse} der obigen 3 Lösungen sind in der beiliegenden Figur 3 dargestellt. Es war festzustellen, daß die Lichtabsorptionserhöhung der auf 100°C gehaltenen Lösungen nicht linear war. Im Bereich von 0 bis 1 Stunde zeigten die durch Lyophilisation rückgewonnenen Substanzen bei der Dünnschichtchromatographie und Hochdruckflüssigkeitschromatographie keine Zersetzung. Die Substanzen aggregierten in der gewünschten Konzentration die normalen Humanthrombozyten befriedigend.

8) Es wurde aus A-Ristomycinmonosulfat in einer tris-(Hydroxymethyl)-aminomethanolösung [TRIS-Puffer] (pH-Wert = 7,4) eine Lösung mit einer Konzentration von 15 mg/ml hergestellt, welche 12 Wochen lang in einem Kühlschrank bei +4°C gelagert wurde. Mit dieser Stammlösung wurde der übliche Thrombozytenaggregationsversuch 2-wöchentlich durchgeführt beziehungsweise nach Durchführung der entsprechenden Pufferverdünnung (0,2 ml → 10 ml) wurde der  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ -Wert bestimmt.

Während des Versuches blieben die Aggregationsaktivität und der  $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ -Wert der A-Ristomycinmonosulfatlösung unverändert.

### Beispiel 3

Herstellung von bis-(N,N'-Trifluoracetyl)-A-ristomycinmonosulfat

(Formel I mit  $R_4$  = Methylrest,

X = Bisulfatrest [ $\text{HSO}_4$ ] und

Y = Rest der Formel II mit Z = Fluoratom  
und  $n = 0$ )

Es wurden 206 mg A-Ristomycinmonosulfat in 10 ml wasserfreiem Methanol suspendiert, worauf 0,28 ml Trifluoressigsäureanhydrid unter Eiskühlung zugetropft wurde. Das Reaktionsgemisch wurde bei Raumtemperatur stehen gelassen und unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in wasserfreiem Methanol wieder gelöst und erneut eingedampft. Dieser Vorgang wurde noch 3-mal wiederholt, worauf das Produkt in einem Vakuumexsikkator über vorher erhitztem Calciumchlorid und Paraffinspänen bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurde. Ausbeute 90%.

Das so erhaltene bis-(N,N'-Trifluoracetyl)-A-ristomycinmonosulfat zeigte keinen charakteristischen Schmelzpunkt (Zersetzungspunkt). Standardisierung: Auf einer Celluloseschicht im Lösungsmittelgemisch III) a) [im Anschluß an Beispiel 2] beträgt der  $R_f$ -Wert 0,45.

## Analyse:

Für  $C_{99}H_{108}O_{46}N_8F_6$  (2258)

berechnet: F = 5,05%, N = 4,96%;

gefunden: F = 4,91%, N = 4,86%;

F = 4,88%, N = 4,74%.

Das so erhaltene bis-(N,N'-Trifluoracetyl)-A-ristomycinmonosulfat aggregierte die normalen Thrombozyten auf dieselbe Weise wie das A-Ristomycinmonosulfat.

Beispiel 4

## Herstellung der Reagenzien

Es wurden 15,00 g eines den obigen qualitativen Vorschriften entsprechenden A-Ristomycinmonosulfates in einem 1-l Erlenmeyerkolben in 100 ml destilliertem Wasser (pH-Wert = 6,8) suspendiert. Der an der Kolbenwand ausgeschiedene Wirkstoff wurde unter ständigem Schütteln mit einer weiteren Menge von 400 bis 500 ml destilliertem Wasser wieder in Lösung gebracht. Die so erhaltene einen homogenen Wirkstoffgehalt aufweisende Lösung wurde in einen 100 ml Meßkolben faserfrei filtriert, der zum Lösen verwendete Kolben und das Filter wurden quantitativ nachgewaschen und das Meßgefäß wurde bis zur Marke aufgefüllt. Die A-Ristomycinmonosulfatkonzentration der so erhaltenen Lösung betrug 15 mg/ml. (Zur Herstellung eines sterilen Präparates wurde die Lösung 30 bis 60 Minuten lang auf 100°C gehalten und danach auf Raumtemperatur gekühlt). Von dieser Lösung wurden unter Verwendung einer automatischen Füllvorrichtung unter aseptischen Bedingungen genau je 1,00 ml in braune, sogenannte Zerreißverschlußflaschen gefüllt. Die Flaschen wurden durch Schnell-

gefrieren lyophilisiert und verschlossen.

Zur Kontrolle der genauen Füllung und der Vollständigkeit der Lyophilisierung wurde der A-Ristomycinmonosulfatgehalt (15 mg) einiger Flaschen je Charge nach der Hochdruckflüssigkeitschromatographieverfahrensweise [HPLC-Verfahrensweise] und durch Gewichtsbestimmung nachgeprüft.

Zusammenfassung

3334170

41.

Nummer:

Int. Cl.<sup>3</sup>:

Anmeldetag:

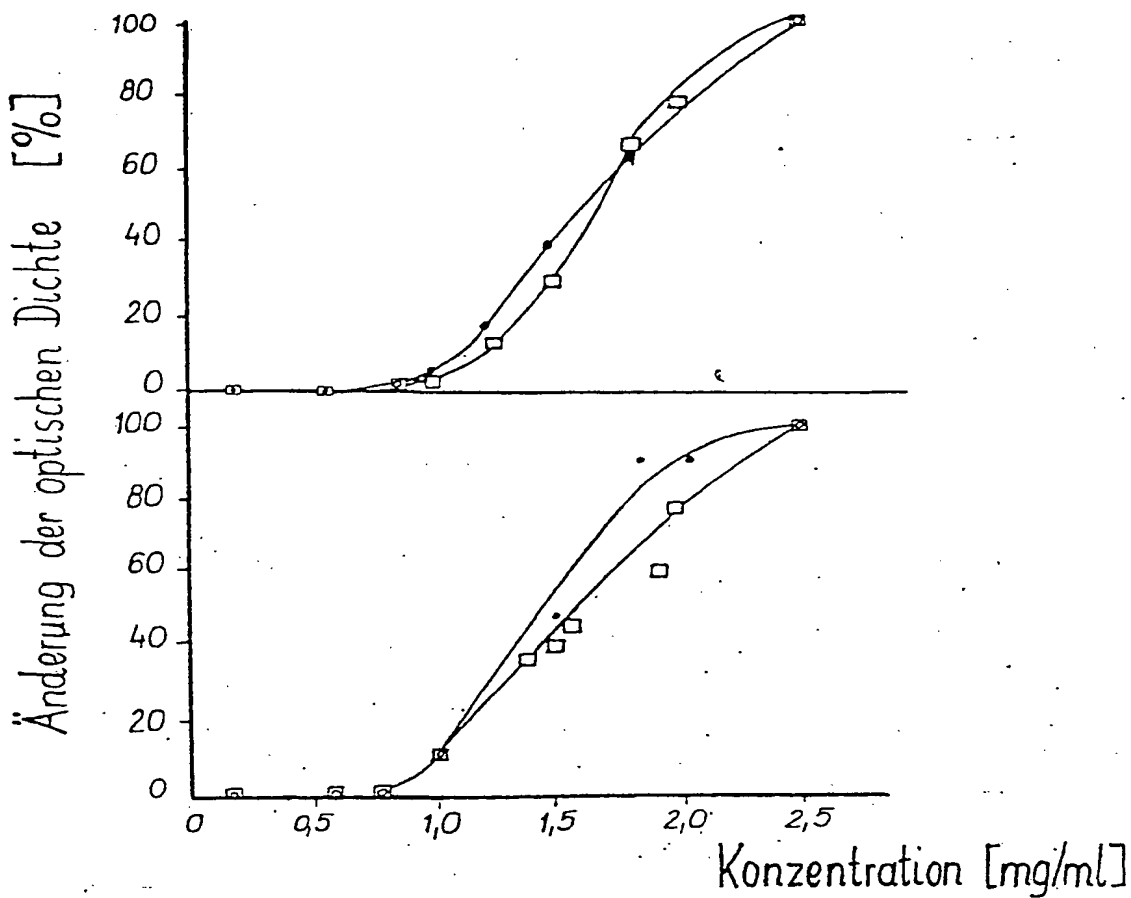
Offenlegungstag:

33 34 170

C. 07 H 17/08

21. September 1983

22. März 1984



Ristocetin [•]

Ristomycin  
(als A-Ristomycin-  
monosulfat) [□]

Fig. 1



3334170

Nummer:

33 34 170

Int. Cl.:

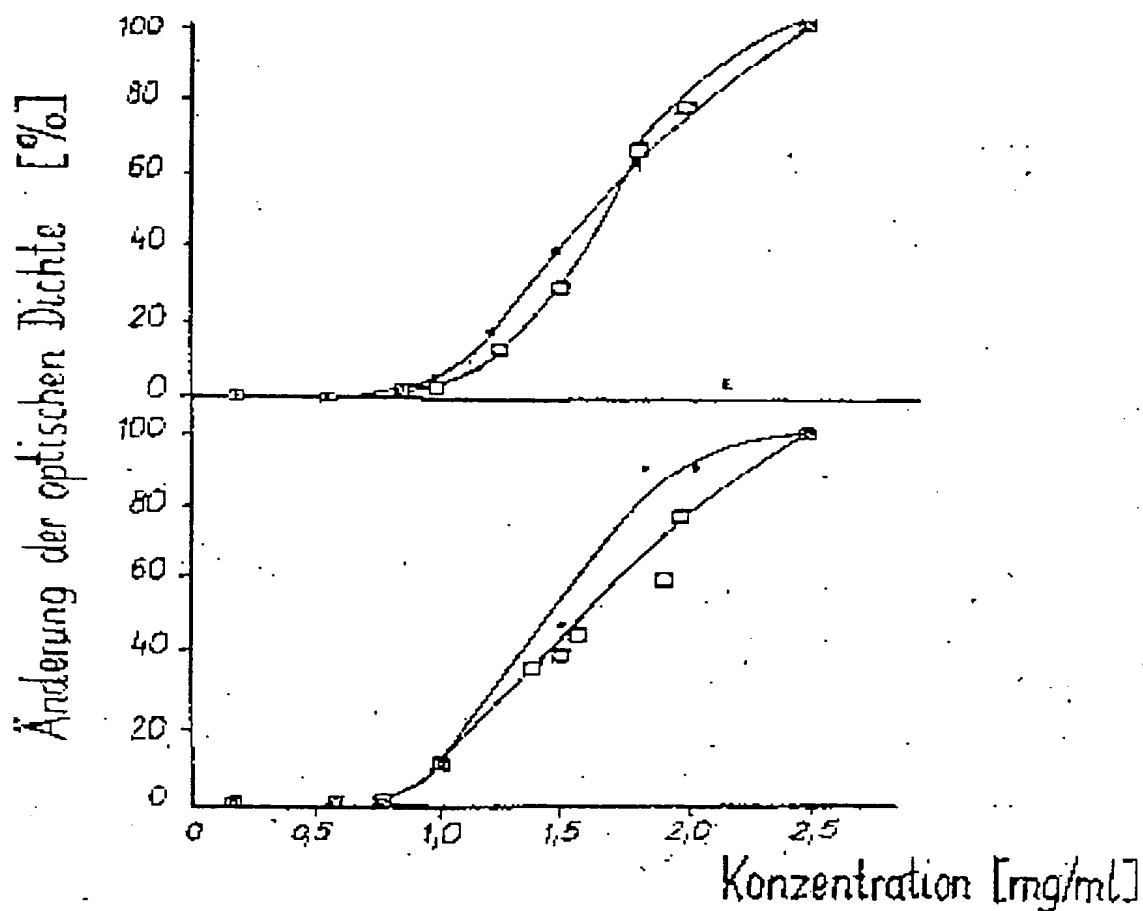
C 07 H 17/06

Anmeldetag:

21. September 1983

Offenlegungstag:

22. März 1984



Ristocetin [•]

Ristomycin  
(als A-Ristomycin-  
monosulfat) [□]

Fig. 1

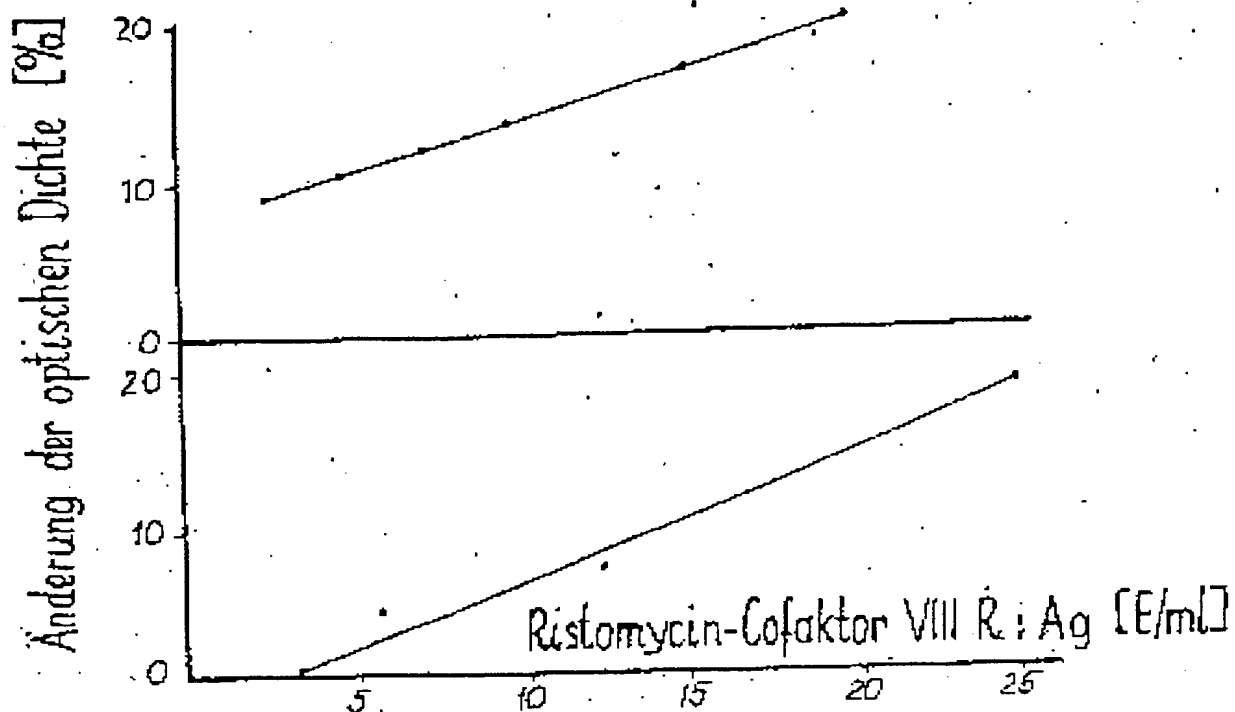


Fig. 2

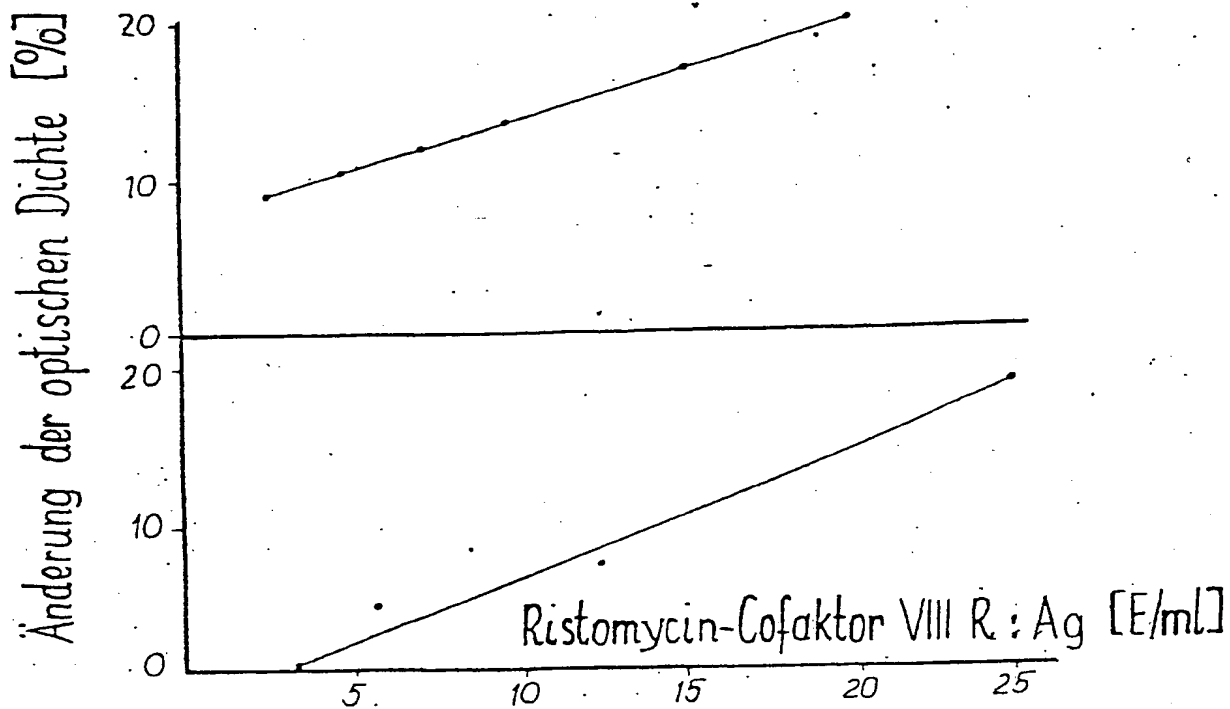


Fig. 2

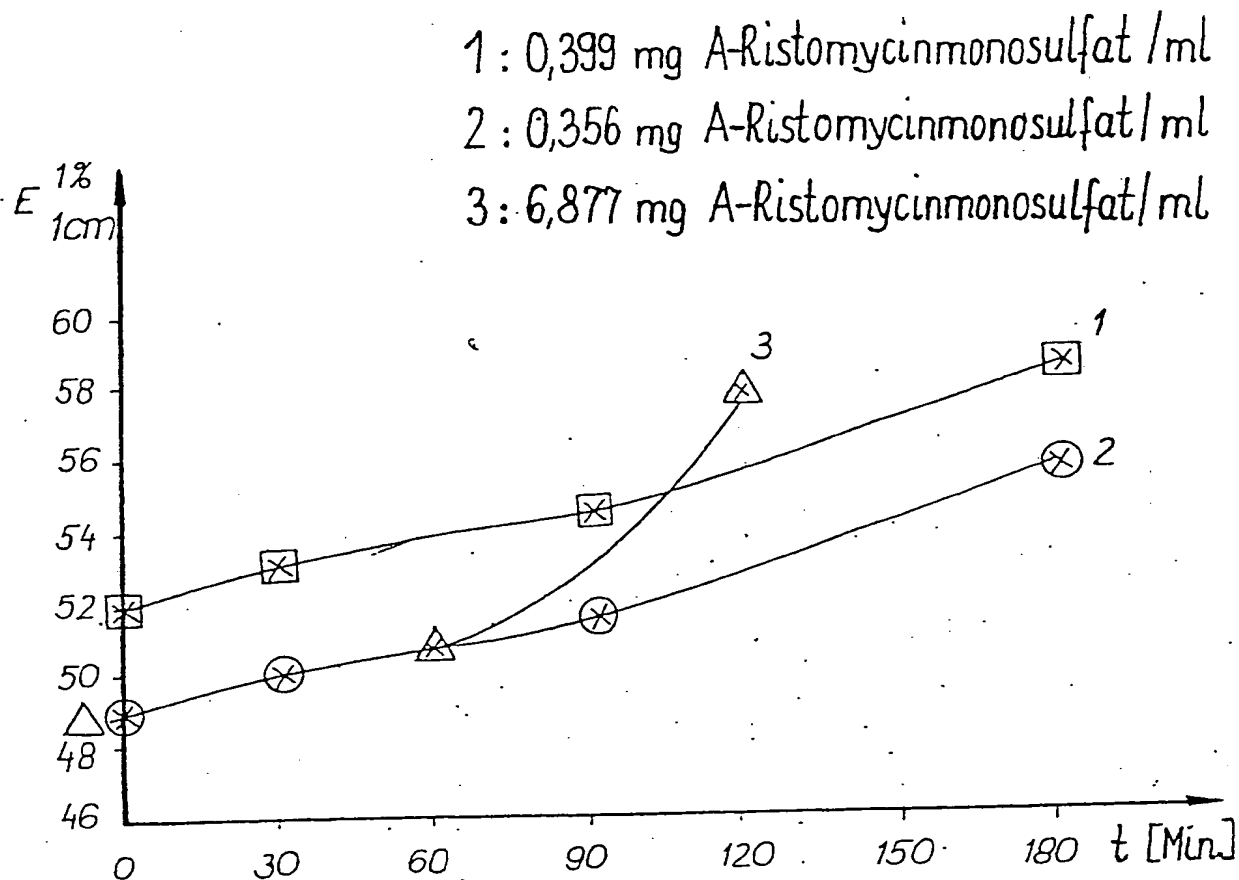


Fig. 3

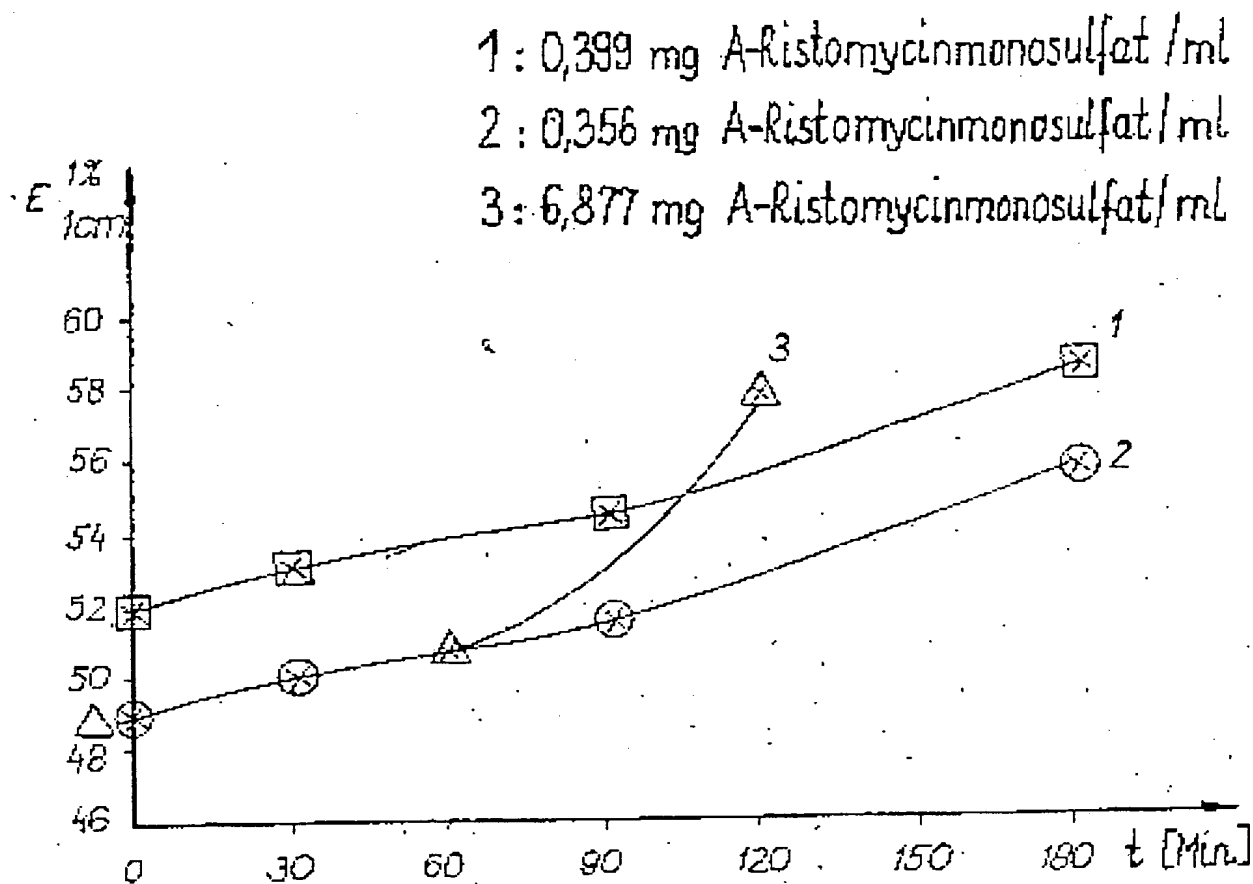


Fig. 3